

Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados

Microbiological quality of raw milk and factors that influence its quality

CITADIN, Ângela Schedler¹; POZZA, Magali Soares dos Santos^{1*}; POZZA, Paulo Cesar¹; NUNES, Ricardo Vianna¹; BORSATTI, Liliane¹; MANGONI, Josiane²

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de Zootecnia, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

*Endereço para correspondência: magaspozza@hotmail.com

RESUMO

Para avaliação das condições microbiológicas do leite cru e estudo de alguns dos fatores que influenciam sua qualidade, foram analisadas 31 propriedades leiteiras do município de Marechal Cândido Rondon. Realizaram-se análises de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes e de bolores e leveduras. Foram analisados tipo de ordenha, lavagem dos utensílios, separação dos animais no momento da ordenha por lotes, lavagem dos tetos e uso de soluções desinfetantes para pré e pós-dipping. Entre as amostras analisadas, 25,8% (para aeróbios mesófilos) e 19,35% (para coliformes a 35°C) apresentaram contagens acima do padrão vigente pela legislação e 58,06% possuíam coliformes termotolerantes. Verificou-se que 64,51% das amostras apresentaram contagem de bolores e leveduras acima de 100 UFC/mL. Em todas as propriedades havia falhas nos procedimentos de higiene e limpeza. Devem ser adotadas medidas mais severas na fiscalização deste tipo de produto, visando garantir maior segurança alimentar ao consumidor.

Palavras-chave: higiene, microbiologia, segurança alimentar

SUMMARY

In order to investigate the microbiological conditions of raw milk and some factors that influence its quality, 31 dairy farms of municipality of Marechal Cândido Rondon were evaluated. Analyses of aerobic mesophilic microorganisms, coliforms at 35°C, thermotolerant coliforms and fungi and yeasts were accomplished. The following issues were evaluated: type of milking management, cleaning of utensils, separation of animals in batches during milking, teat washing and use of pre and post dipping disinfectant solution. The results showed that 25.8% (for aerobic mesophilic) and 19.35% (for coliforms at 35°C) of the analyzed samples had their counting above the actual legislation standard and 58.06% of the samples were contaminated with thermotolerant coliforms. It was verified that 64.51% of samples had fungi and yeasts counting above 100 UFC/mL. There were failures at hygiene and cleaning procedures in all dairy farms. Severe regulatory policies must be adopted for this kind of product aiming a food safety warranty to the customer.

Keywords: food safety, hygiene, microbiology

INTRODUÇÃO

A globalização de mercado tornou o consumidor brasileiro mais exigente com a qualidade dos produtos oferecidos. Com a modernização da indústria laticinista, que passou a exigir do produtor um leite de melhor qualidade, foram implementadas normas nacionais de padrão de qualidade de leite pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela Normativa 51 (IN 51), por intermédio do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade de Leite (BRASIL, 2002), com vistas ao estabelecimento de critérios para a produção, identidade e qualidade do leite. Isto gerou a implementação de melhorias como a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (MARTINS, 2004). O principal objetivo desta medida é limitar o desenvolvimento da microbiota mesofílica, usada por muitos pesquisadores para diagnosticar possíveis múltiplos problemas nos rebanhos leiteiros (JAYARAO et al., 2004) – a maioria dos contaminantes do leite, seja deterioradores ou patógenos – e para avaliar as condições higiênicas em que o produto foi processado (TEIXEIRA et al., 2000).

Entre os microrganismos indicadores de contaminação, incluem-se os coliformes a 45°C ou termotolerantes, grupo de bactérias Gram negativas com alta incidência de *Escherichia coli* (MACIEL et al., 2008).

Os principais agentes ambientais causadores de mastite são enterobactérias, estreptococos, actinomicetos, fungos e algas (YAMAMURA et al., 2007). A ocorrência de casos esporádicos de mastite causados por microrganismos de origem ambiental pode ser considerada como emergente e as leveduras, os fungos

leveduriformes e os filamentosos são alguns dos principais agentes envolvidos. Em relação à mastite micótica, as leveduras são frequentemente causas de infecções da glândula mamária em animais produtores de leite. A maior parte dos casos ocorre sob a forma de surtos localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos (SPANAMBERG et al., 2009).

Neste estudo foi avaliada a qualidade higiênico-sanitária do leite cru obtido de propriedades leiteiras do município de Marechal Cândido Rondon, estado do Paraná, por intermédio de microrganismos indicadores de qualidade sanitária e de microrganismos com capacidade para modificar as características do produto. Objetivou-se também realizar um estudo sobre a incidência de alguns fatores que influenciam a qualidade do leite cru resfriado estocado e submetido à coleta a granel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras, durante os meses de verão, provenientes de 31 propriedades leiteiras, localizadas no município de Marechal Cândido Rondon, no estado do Paraná. Foram coletados 100 mL de leite cru, diretamente dos tanques de expansão ou de latões, em frascos esterilizados, transportados sob condições isotérmicas para imediato processamento no laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Unioeste.

Para contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos, alíquotas de 1 mL das diluições foram inoculadas, em duplicatas, em ágar padrão para contagem (Standard Methods Agar, Acumedia, Baltimore, Maryland) utilizando-se a técnica da semeadura em

profundidade, segundo metodologia preconizada pela American Public Health Association e incubadas a 35°C durante 48 horas.

Para determinação do Número mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C por mL (CT/mL) de amostra, foi adotada a técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se o meio caldo lactosado (lactose broth, Acumedia, Baltimore, Maryland) e o caldo bile verde brilhante 2% - VB (brilliant green bile broth 2%, Himedia, India), em três tubos por diluição, a 35°C por 24 a 48 horas. Tubos de caldo lactosado positivos foram repicados para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC broth, Acumedia, Baltimore, Maryland), utilizado para determinar a presença de coliformes termotolerantes. Após incubação a 44,5°C durante 24 horas, foi verificado o número dos tubos com crescimento positivo (turbidez e gás) e determinado o NMP/mL (APHA, 2001).

O nível de contaminação por bolores e leveduras foi determinado por diluições decimais de 100 mL de leite, semeados em duplicata pela técnica da semeadura em profundidade em batata dextrose agar PDA (dextrose potato agar, Acumedia, Baltimore, Maryland) acidificado com solução de ácido tartárico a 10%, em pH 3,5. As placas foram incubadas a 25 ± 2°C por cinco dias (ARAÚJO et al., 2001)

Foram analisados também outros fatores que podem interferir na qualidade do leite: tipo de ordenha, lavagem dos utensílios, utilização de água quente, mergulho do teto em água clorada, utilização de luvas e botas de borracha, separação dos animais no momento da ordenha por lotes (animais sadios, com mastite subclínica ou clínica, colostro), lavagem dos tetos, uso de papel-toalha, iodo e soluções desinfetantes para pré e pós-dipping. Os valores de temperatura

de estocagem do leite foram medidos no termômetro do tanque. As informações foram obtidas por meio de questionários e todos os dados anotados em fichas para posterior análise.

Os coeficientes de correlação foram obtidos por meio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (UFV, 1999), pelo teste de correlação de Spearman a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o limite de 10⁶ UFC/mL de aeróbios mesófilos em leite cru refrigerado (BRASIL, 2002), 25,8% das amostras analisadas estavam em desacordo com a IN51 (Tabela 1).

Em amostras de leite cru, Nero et al. (2005) também constataram incidência elevada (48,6%) de amostras que apresentaram contagens de aeróbios mesófilos acima do determinado pela IN51 evidenciando dificuldades dos produtores em adequação às normas estabelecidas.

Pinto et al. (2006), avaliando a população de aeróbios mesófilos em amostras de leite cru provenientes de tanques individuais e coletivos, obtiveram valores de 1,4 x 10⁶ a 5,5 x 10⁶ UFC/mL, também acima do padrão estabelecido. Segundo esses autores, a menor variação na contagem pode estar associada à constante homogeneização do leite no silo, enquanto a maior contaminação destas amostras pode decorrer da mistura de leite cru de diferentes origens e graus de contaminação. Além disso, deve-se considerar que podem ocorrer contaminações adicionais e crescimento microbiano durante o transporte e estocagem na indústria.

Tabela 1. Contagens médias de microrganismos em leite cru resfriado em diferentes propriedades do oeste paranaense

Amostras	Aeróbios mesófilos *(UFC/mL)	Coliformes a 35°C* (UFC/mL)	Coliformes termotolerantes *(UFC/mL)	Bolores e leveduras *(UFC/mL)
01	2,41 x10 ⁴	4,50x10 ²	4,50 x10 ²	1,00x10 ²
02	1,02 x10 ⁵	6,00x10 ¹	aus.	7,00x10 ¹
03	3,79 x10 ⁶	1,40x10 ⁴	1,10 x10 ⁴	1,20x10 ⁵
04	6,00 x10 ⁴	1,50x10 ³	2,50 x10 ²	3,15x10 ²
05	1,27 x10 ⁵	3,00x10 ²	aus.	7,75x10 ²
06	1,34 x10 ⁵	3,50x10 ²	6,00 x10 ¹	2,75x10 ²
07	5,30 x10 ⁴	1,10x10 ⁴	1,60 x10 ¹	1,75x10 ²
08	2,86 x10 ⁶	3,00x10 ²	1,50 x10 ²	4,35x10 ⁴
09	5,95 x10 ⁵	9,50x10 ²	aus.	9,40x10 ²
10	2,24 x10 ⁶	4,50 x10 ¹	2,50 x10 ¹	5,95x10 ³
11	1,26 x10 ⁵	aus.	aus.	8,25x10 ²
12	5,15 x10 ⁵	7,00 x10 ¹	aus.	7,20x10 ²
13	1,30 x10 ⁵	aus.	aus.	9,00x10 ¹
14	1,35 x10 ³	aus.	aus.	4,50x10 ¹
15	3,75 x10 ⁵	2,50 x10 ²	4,00 x10 ¹	6,00x10 ¹
16	2,99x10 ⁵	4,00x10 ¹	3,00x10 ¹	6,00x10 ²
17	6,05 x10 ⁵	aus.	aus.	6,70x10 ³
18	4,01 x10 ⁵	1,10 x10 ⁴	3,00 x10 ¹	2,60x10 ²
19	2,02 x10 ⁵	1,40 x10 ⁴	1,10 x10 ²	8,50x10 ¹
20	1,46 x10 ⁶	9,50 x10 ²	4,50 x10 ¹	8,00x10 ¹
21	2,99x10 ⁵	4,00x10 ¹	3,00x10 ¹	8,45x10 ²
22	1,50x10 ⁶	9,50x10 ²	9,50x10 ¹	6,85x10 ³
23	6,90x10 ³	aus.	aus.	aus.
24	6,55x10 ⁵	2,00x10 ²	1,10x10 ²	6,00x10 ¹
25	3,05x10 ⁵	1,50x10 ³	7,50x10 ²	3,55x10 ²
26	2,29x10 ⁶	9,00x10 ¹	7,00x10 ¹	7,80x10 ²
27	3,70x10 ⁵	9,50x10 ²	4,50x10 ²	3,30x10 ²
28	2,25x10 ⁶	4,00x10 ²	aus.	8,50x10 ¹
29	7,50x10 ³	2,50x10 ¹	4,00x10 ⁰	5,50x10 ¹
30	4,45x10 ⁵	2,00x10 ²	aus.	8,00x10 ³
31	3,90x10 ⁶	4,00x10 ¹	aus.	1,20x10 ³

UFC/mL = unidades formadoras de colônia por mL; aus. = ausente.

Altas contagens bacterianas também foram constatadas por Rosa & Queiroz (2007), em 20 amostras de leite cru entregues em um laticínio no estado do Rio Grande do Sul. Os autores verificaram que 80% das amostras possuíam contagens de aeróbios

mesófilos acima do limite estabelecido pela IN 51.

Contagens de coliformes a 35°C acima 1,0 ×10³ UFC/mL, indicativo de deficiências de higiene na produção de leite, foram verificadas em seis

propriedades, ou seja, 19,35% das amostras avaliadas nesta pesquisa.

Os coliformes são indicadores de contaminação do ambiente e das fezes (BRITO et al., 2002), evidenciando a importante contribuição da higiene do momento da ordenha para a contagem bacteriana total do leite.

Verificou-se em 58,06% das propriedades a presença de coliformes termotolerantes, com valor máximo de $1,10 \times 10^4$ UFC/mL. Okura & Ávila (2004) analisaram leite cru de microrregiões do Triângulo Mineiro e identificaram 21,40% de *Escherichia coli* em aproximadamente 70 cepas suspeitas.

Maciel et al. (2008) avaliaram 30 amostras de leite cru obtidas em três pontos de venda no município de Itapetinga – BA e verificaram que todas as amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes, de $1,5 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^5$ e de $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^4$ NMP/mL, respectivamente.

Catão & Ceballos (2001) analisaram 45 amostras de leite cru no estado da Paraíba e constataram que todas as amostras apresentaram elevada incidência de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes e *E. coli*, o que comprova a elevada contaminação da matéria-prima. Tebaldi et al. (2008) verificaram que 31,25% das amostras avaliadas apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima de 10^3 NMP/mL.

Apesar da inexistência de padrão microbiológico para a enumeração de bolores e leveduras, neste estudo obtiveram-se valores entre $5,5 \times 10^1$ e $1,2 \times 10^5$ UFC/mL nas amostras de leite, constatando-se que 64,51% das amostras apresentaram contagem de bolores e leveduras acima de 100 UFC/mL, o que indica higiene insatisfatória durante o processo de ordenha e deficiências do equipamento de ordenha.

Mutukumira et al. (1996) constataram contagens de leveduras e fungos filamentosos inferiores a 100 UFC/mL em sete das 10 amostras analisadas. Por sua vez, a média de contagem de leveduras observada por Desmaures et al. (1997), ao avaliarem 20 propriedades leiteiras, foi de $6,9 \times 10^1$ UFC/mL de leite.

Sabois et al. (1991) avaliaram 17 propriedades e verificaram contagens superiores a 1.000 UFC/mL em todas as amostras, o que indica higiene insatisfatória durante o processo de ordenha e deficiências do equipamento de ordenha. Resultados semelhantes foram obtidos por Ruz-Peres et al. (2004), ao detectarem a presença de fungos e leveduras em todas as 50 amostras coletadas de tanques de expansão. Segundo esses autores, deve-se atentar para a presença de fungos e leveduras no leite, que implica riscos potenciais à saúde humana.

Durante as coletas foram obtidas informações sobre a higienização e os métodos aplicados durante a ordenha. Verificou-se que apenas uma propriedade utilizava papel-toalha para secagem dos tetos, 64,5% utilizam ordenha mecânica, 70,96% utilizavam água quente para lavagem dos utensílios, 38,71% mergulhavam as teteiras em água clorada, 83,87% dos funcionários utilizavam boné e 80,64% utilizavam botas de borracha, apenas 6,45% usavam iodo nos tetos como método de desinfecção, 16,12% utilizavam desinfetantes pré-*dipping* e 12,90% pós-*dipping*, por considerarem de alto custo a aquisição destes desinfetantes. A temperatura dos tanques variou entre 2 e 5°C. Com base no questionário aplicado, constatou-se que em todas as propriedades havia falhas nos procedimentos de higiene e limpeza, o que pode aumentar os riscos

de contaminação do leite por microrganismos. Para que a qualidade do leite seja melhorada, é importante investir na conscientização e no treinamento de pessoal, visando melhoria da higiene de produção e adequada limpeza de utensílios e equipamentos. A correlação entre número de vacas e produtividade foi positiva ($r = 0,88$) e significativa ($p > 0,05$). Entretanto, os resultados demonstraram baixa correlação ($r = 0,18$) entre as contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes a

35°C, apesar do grupo das bactérias aeróbias mesófilas ser constituído por espécies de *Enterobacteriaceae*, que incluem os coliformes; além de *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Streptococcus* (SILVA et al. 1997) (Tabela 2). O coeficiente de correlação das contagens de coliformes termotolerantes e de coliformes a 35°C foi de 0,63, resultado que corrobora com dados da literatura, pois os coliformes termotolerantes pertencem ao grupo dos coliformes a 35°C.

Tabela 2. Correlações de Spearman entre as variáveis avaliadas

Variável	Variável	Correlação	Significância
Vacas	Produtividade	0,8846	0,0000
Vacas	Contagem total	-0,1723	0,1727
Vacas	Colif. termot.	-0,1561	0,1963
Vacas	Colif. a 35°C	-0,3180	0,0408
Produtividade	Contagem total	-0,1556	0,1971
Produtividade	Colif. termot.	-0,1251	0,2466
Produtividade	Colif. a 35°C	-0,3906	0,0162
Contagem total	Colif. Termot	0,2023	0,1339
Contagem total	Colif. a 35°C	0,1812	0,1605
Colif. termot	Colif. a 35°C	0,6323	0,0003

Colif. termot = coliformes termotolerantes; Colif. a 35°C = coliformes a 35°C; Contagem total = contagem de aeróbios mesófilos.

Arcuri et al. (2006) verificaram adesão de 83% ao requisito estabelecido pela IN 51 para aeróbios mesófilos e contagem média de coliformes acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL em sete rebanhos. Houve correlação positiva ($r=0,61$; $P < 0,01$) entre as contagens de mesófilos e de coliformes a 35°C, indicando a importante contribuição da higiene do momento da ordenha para a contagem bacteriana total do leite. Correlações negativas foram obtidas entre número de vacas e contagens de aeróbios totais ($r = -0,17$), coliformes termotolerantes ($r = -0,15$) e coliformes

a 35°C ($r = -0,31$). Foram encontradas também correlações negativas entre as contagens de aeróbios totais ($r = -0,15$), coliformes termotolerantes ($r = -0,12$) e coliformes a 35°C ($r = -0,39$). Verificou-se que as propriedades com maior produtividade e maior número de animais utilizavam ordenha mecânica, o que confere ao leite melhor qualidade, pois ocorre diminuição do contato direto com o produto, o qual é canalizado para o tanque de refrigeração, onde é armazenado sob temperatura ideal até o momento da coleta, evitando, desta forma, a proliferação bacteriana. Elevadas

concentrações de microrganismos indicadores de qualidade foram encontradas no leite cru refrigerado indicando necessidade de investimentos em técnicas de boas práticas para prevenção de contaminação.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA.

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA, 2001. 676p. [[Links](#)].

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; BANAS, S.L.B.; SILVEIRA, V.F. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.1, p.10-14, 2001. [[Links](#)].

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ANGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazenda. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006. [[Links](#)].

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, n. 172, p.13-22, 2002. Seção I. [[Links](#)].

BRITO, M.A.V.P.; BRITO J.R.F.; PORTUGAL J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, p.47-52, 2002. [[Links](#)].

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* ssp, coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* no leite cru e pasteurizado de uma industria de laticínios, no estado da Paraíba (BR). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.281-287, 2001. [[Links](#)].

DESMASURES, N.; OPPORTUNE, W.; GUEGUEN, M. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. **International Dairy Journal**, v.7, p.643-646, 1997. [[Links](#)].

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S.R.; SWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEDGE, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal Dairy Science**, v.87, n.10, p.3561-3573, 2004. [[Links](#)].

MACIEL, J.F.; CARVALHO, E.A.; SANTOS, L.S.; ARAUJO, J.B.; NUNES, V.S. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado em Itapetinga. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p.443-448, 2008. [[Links](#)].

MARTINS, M.C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v.13, n.3, p.38-51, 2004. [[Links](#)].

MUTUKUMIRA, A.N.; FERESU, S.B.; ABRAHANSEN, R.K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, v.59, n.9, p.984-987, 1996. [[Links](#)].

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOT, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO; J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.191-195, 2005. [[Links](#)].

OKURA, M.H.; ÁVILA, F.A. Isolamento de enteropatógenos de leite cru produzido nas micro-regiões de Triangulo Mineiro, MG. **FAZU em Revista**, n.1, p.11-20, 2004. [[Links](#)].

PERES, M.R.; YOKAYA, E.; PASSARELLI, D.; CANTARIO, S;C.; BENETTIS, N.R; MELVILLE, P.A. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004. [[Links](#)].

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, 645-651, 2006. [[Links](#)].

ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.422-430, 2007. [[Links](#)].

SABOIS, A.; BASILICO, J.C.; SIMONETTA, A. Microbiological quality of raw milk: incidence of aerobic and anaerobic spore-forming bacteria, yeasts and fungi. **Revista Argentina de Lactologia**, v.3, n.5, p.79-90, 1991. [[Links](#)].

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise Microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p. [[Links](#)].

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A.; PICCOLI, R.H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008. [[Links](#)].

TEIXEIRA, A.M.; MASSAGUER, P.R.; FERREIRA, E.C.; TOSELLO, R.M. Agilizando a contagem de bactérias em leite cru brasileiro. **Indústria de Laticínios**, v.4, n.25, p.46-49, 2000. [[Links](#)].

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1999. 59p. [[Links](#)].

SPANAMBERG, A.; SANDES, E.M.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L.F. Mastite micótica em ruminantes causadas por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.282-290, 2009. [[Links](#)].

YAMAMURA, A.A.M.; MULLER, E.E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; CONSENSA, M.; SILVA, P.F.N.; GODOY, A. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de tanques de expansão e do ambiente dos animais. **Semina - Ciências Agrárias**, v.28, n.1, p.105-114, 2007. [[Links](#)].

Data de recebimento: 05/11/2007

Data de aprovação: 02/12/2008